Vestnik zoologii, **40**(4): 291—296, 2006

УДК 576.893.195(265.5)

ПЕРША РЕЄСТРАЦІЯ МІКРОСПОРИДІЇ РОДУ *LOMA* (MICROSPORIDIA, GLUGEIDAE) У РИБ ЧОРНОГО МОРЯ

М. О. Овчаренко[1, 2], В. М. Юрахно[3]

[1] *Іститут зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України, вул. Б. Хмельницького, 15, Київ, 01601 Україна*
[2] *Інститут паразитології ім. Вітольда Стефаньського ПАН, вул. Тварда, 51/55, Варшава, 00818 Польща*
[3] *Інститут біології південних морів НАН України, просп. Нахімова, 2, Севастополь, 99011 Україна*

Отримано 30 травня 2005

Первая регистрация микроспоридии рода *Loma* (Microsporidia, Glugeidae) у рыб Черного моря. Овчаренко М. А., Юрахно В. М. — Изучена структура и обозначена родовая принадлежность новой микроспоридии из кишечника усатой черноморской барабули — *Mullus barbatus ponticus* Essipov, 1927 (Mullidae). Стадии развития паразита представлены одноядерными споронтами, размером 2,6 × 5,2 мкм, споробластами и яйцевидными спорами размером 3,6—4,1 × 2,1—2,4 мкм (живые), с большой задней вакуолью, содержащей постеросому. Каждый споронт формирует два споробласта. Стенка споры состоит из внутренней плазматической мембраны, эндоспоры и экзоспоры толщиной 60 и 20 нм. Изофилярный полярный филамент формирует однослойную спираль, из 8—9 витков. Проанализированы существующие данные о микроспоридиях рыб семейства барабулевых, и представлена сравнительная характеристика родов *Glugea* и *Loma*.

Ключевые слова: Черное море, Microsporidia, *Loma*, *Mullus barbatus ponticus*.

First Registration of *Loma* (Microsporidia, Glugeidae) Belonging Microsporidia in Black Sea Fish. Ovcharenko M. O., Yurahno V. M. — The structure of a new microsporidian parasite from intestine wall of *Mullus barbatus ponticus* Essipov, 1927 (Mullidae) is studied, and generic position is established. Uninucleate sporonts measuring about 2.6 × 5.2 ì m, sporoblasts and ovoid spores 3.6—4.1 × 2.1—2.4 ì m (fresh) in size containing big posterior vacuole with posterosome are described. Each sporont produces two sporoblasts. The spore wall consists of endoplasmic membrane, endospore and exospore about 60 and 20 nm wide. Isofilar polar filament is coiled into 8—9 turns. Existing data concerning microsporidia of the fishes from the family Mullidae are analyzed, and comparative characteristics of the genera *Glugea* and *Loma* (Microsporidia, Glugeidae) are presented.

Key words: Black Sea, Microsporidia, *Loma*, *Mullus barbatus ponticus*.

Вступ

Мікроспоридій з роду *Loma* відносять до внутрішньоклітинних паразитів, що мають виключно важливе економічне значення для риболовства та марикультури (Hauck, 1984). Захворювання та масову загибель молоді піленгаса, викликану паразитуванням *Loma mugili* Ovcharenko et al., 2000 відзначено і в Україні (Мальцев, 1999; Овчаренко та ін., 2000). Мікроспоридій, що утворювали цистоподібні структури (ксеноми), було вперше зареєстровано у стінці задньої частини кишкового тракту вусатої чорноморської барабулі — *Mullus barbatus ponticus* Essipov, 1927 (родина Mullidae — барабулеві) під час проведення паразитологічного аналізу риб, виловлених у Мартиновій затоці, що в м. Севастополі (Чорноморське узбережжя Криму). Після вивчення морфології та ультраструктури спор і стадій спорогонії, паразитів попередньо віднесено до роду *Loma*, Morrison, Sprague, 1981. Опис вивчених стадій життєвого циклу виявлених нами мікроспоридій та деяких деталей ультратонкої будови їхніх спорліг у основу цього повідомлення. На підставі порівняльної характеристики близьких родів *Glugea* і *Loma* визначено родову приналежність мікроспоридій та обговорено їхнє систематичне положення.

Матеріал і методи

Паразитологічні дослідження риб проводили у затоках м. Севастополя протягом літньо-осіннього періоду 2003—2004 рр. За час спостережень обстежено 291 особину *M. barbatus ponticus* (53 — у

жовтні–листопаді 2003 р. і 138 — у червні, липні та жовтні 2004 р.). Ксеноми мікроспоридій виявлено у 2 з 21 особин барабулі (екстенсивність зараження — 10%), відловлених 22 травня 2003 р. у Мартиновій затоці Чорного моря (м. Севастополь, Крим). Інфіковані тканини зафіксовано у рідині Буена, а гліцерин-желатинові препарати спор піддано мікроскопічному аналізу з використанням методів фазового контрасту. Морфометричні показники спор визначали за допомогою окуляр-мікрометра (щонайменш 50 промірів з кожного препарату), використовуючи імерсійні системи та максимальне збільшення мікроскопу МБИ—3 (× 1350). Для подальшого аналізу матеріал було передано до лабораторії паразитичних Protozoa Інституту паразитології ПАН у м. Варшаві (Польща). З фіксованого у рідині Буена матеріалу виготовлено мазки та препарати спор згідно стандартних процедур. Мазки забарвлено азур-еозином за Романовським-Гімза (Vávra, Maddox, 1976; Овчаренко 2002). Їх аналіз здійснено на мікроскопі Olympus BX50F4 (× 1200, масляна імерсія, інтерференційний контраст). Сканометричні дані (100 промірів кожного з трьох препаратів) було статистично оброблено з використанням програми «Analysis Pro 2.11». Здійснено спробу аналізу ультраструктури матеріалу, який будо передано до Інституту паразитології ПАН. Оскільки у нашому розпорядженні знаходились лише відпрепаровані сегменти заражених тканин, фіксовані у рідині Буена, проведення класичної процедури обробки стало неможливим. Отриманий матеріал витримано у 70%-вому розчині етанолу протягом доби, промито у 30%-вому розчині етанолу та у 0,05 М кадилатному буфері (pH 7,4) з доданням 0,12 М розчину сахарози і 5 mM розчину $CaCl_2$. Після цього тканини помістили на 2 години у 2,5%-вий розчин глутарового альдегіду на 0,05 М какодилатному буфері (pH 7,4) та на 1 год у 2,0%-вий розчин OsO_4. Процес постфіксації проводили при температурі 4°C. Оброблений за вказаною схемою матеріал було зневоднено та вміщено у полімеризаційну суміш на основі епону (Epon 812). Напівтонкі зрізи забарвлено 1,0%-вим водним розчином толуїдину. Ультратонкі зрізи відконтрастовано ураніл ацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом. Ультраструктуру вивчали на трансмісійному мікроскопі JEM 100Вб з використанням прискорюючої напруги 80 кВ.

Результати

Ксеноми мікроспоридій виявлено у стінках задньої частини травного каналу двох самців *M. barbatus ponticus* (L = 11,5 і 12,6 см). У першій особині виявлено 140 ксеном, в іншій — 10. Живі ксеноми паразита мали розміри 0,2—1,0 мм, фіксовані у рідині Буена — 0,3 ± 0,1 (0,2—0,7) мм (рис. 1). Молоді та старі тонкостінні ксеноми кулястої форми розміщувались поодинці у субепітеліальному шарі стінки ректума та містили численні спори і стадії розвитку паразита.

Матеріал, фіксований у рідині Буена, не дає можливості прецизійного аналізу ультраструктури, однак деякі елементи будови клітини (будова стінок спор та споробластів, структура полярного філаменту та задньої вакуолі) все ж вдалося проаналізувати.

Найраніші з досліджених нами стадій розвитку паразита були представлені одноядерними споронтами видовженої форми, розміри яких (у середньому) складали 2,6 × 5,2 мкм. Молоді споронти часто утворювали протуберантні вирости, що збільшували їхню поверхню. Внаслідок поділу кожен споронт формував 2 споробласти. При дозріванні споробласти набували широкоовальної форми.

Одноядерні яйцеподібні спори паразита мали задню вакуоль, що займала більш як половину їхнього об’єму (рис. 2, 6). Живі спори мали розміри 3,6—4,1 × 2,1—2,4 мкм, а довжина задньої вакуолі складала 2,0—2,4 мкм. Спори, зафіксовані у рідині Буена, мали розміри 2,4 ± 0,2 (2,0—2,9) × 4,1 ± 0,3 (3,6—4,7) мкм. На препаратах, забарвлених азур-еозином, задня вакуоль виглядала безбарвною (рис. 3), проте, на ультратонких зрізах виявлено наявність у ній структурованої постеросоми (рис. 4).

Поляропласт займав біля чверті об’єму спори. Його ультраструктуру не вдалося дослідити, проте вигляд вмісту спор на забарвлених препаратах та характер зображень спор, отриманих за допомогою методу оберненого фазового контрасту, дозволяють передбачити пластинчастий характер частини цього органоїду, що виглядає як прозора або злегка забарвлена зона (рис. 3, 6). Тонкостінні спори мали класичну будову спорової оболонки, яка складалася із внутрішньої плазматичної мембрани, електроннопрозорої ендоспори біля 60 нм завтовшки та безструктурної електронногустої екзоспори товщиною біля 20 нм (рис. 4, 5).

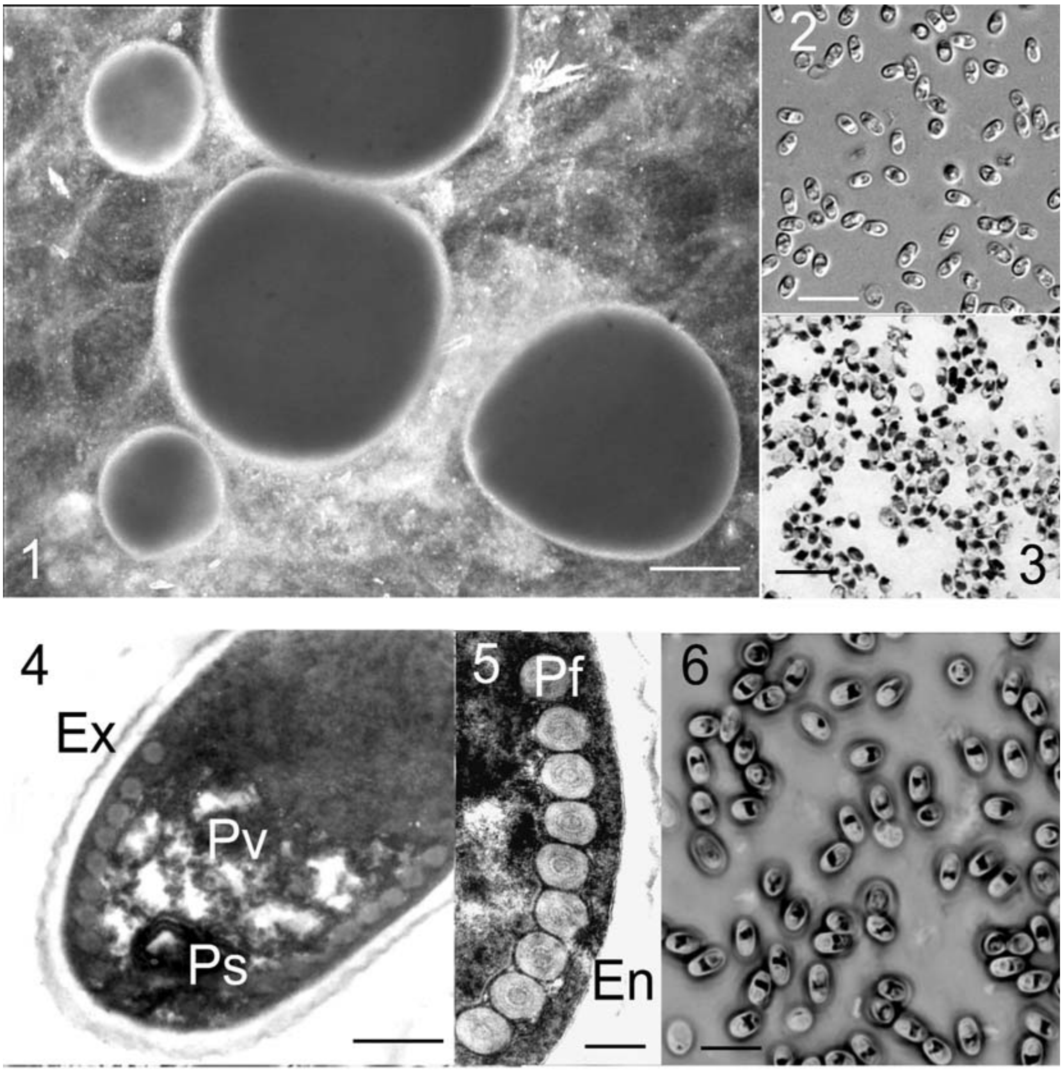


Рис. 1—6. Ксеноми та спори *Loma* sp. 1 — Ділянка стінки травного каналу з молодими та зрілими тонкостінними ксеномами, локалізованими у стінці ректума. 2, 6 — Фіксовані у рідині Буена спори. Зображення отримані за допомогою методів інтерференційного (2) та оберненого фазового контрастів (6). Спороплазма сідлоподібної форми, розміщена у центральній частині спори поміж великою задньою вакуоллю та поляропластом, що займає біля чверті об'єму спори. 3 — Спори, забарвлені азур-еозином. 4 — Навскісний зріз задньої частини спори. Стінка спори складена з електронно-прозорої ендоспори та екзоспори (Ex). Задня вакуоль (PV) містить постеросому (Ps). Ізофілярний полярний філамент утворює спіраль, завитки якої розмішені в один ряд. 5 — Повздовжній зріз частини спори з 9 завитками багатошарового полярного філаменту (Pf). Показано також ендоспору (En), вкриту гомогенно-структурованою електронно-густою екзоспорою. Масштабні лінійки: 1 — 0,1 мм; 2 — 9,0 мкм; 3 — 7,0 мкм; 4 — 0,3 мкм; 5 — 0,15 мкм; 6 — 5,3 мкм.

Fig. 1—6. Xenomas and spores of *Loma* sp. 1 — Part of the intestine wall containing young and mature xenomas, which are located in submucosal layer of the rectum. 2, 6 — Spores, fixed in Bouine fluid. Micrographs were obtained using interference- (2) and inverted phase contrast (6) methods. Sporoplasm occupies central part of the spore between polaroplast and big posterior vacuole. Polaroplast engages about ¼ spore volume. 3 — Giemsa stained spores. 4 — Longitudinal sectioned posterior part of the spore. The spore wall is constructed of electron-lucent endospore and exospore (Ex). Posterior vacuole (Pv) contains posterosome (Ps). The spiral part of polar filament is arranged in a single row. 5 — Posterior section of mature spore with 9 coils of multilayered isofilar polar filament (Pf). Endospore (En) is covered by homogenous electron-dense exospore. Scale bars: 1 — 0.1 mm; 2 — 9.0 μm; 3 — 7.0 μm; 4 — 0.3 μm; 5 — 0.15 μm; 6 — 5.3 μm.

Ізофілярний полярний філамент (діаметр 90—10 нм) утворював у задній частині спори одношарову спіраль, що складалася з 8—9 завитків (рис. 4, 5). На поперечному зрізі полярний філамент виказував класичну будову, з концентрично розміщеними шарами різної електронної густини (рис. 5). Спороплазма розміщувалась у середній частині спори поміж великою задньою вакуоллю та поляропластом у вигляді сідловидної забарвленої структури (рис. 2, 3, 6).

Обговорення

У риб з родини барабулевих (Mullidae) описано два випадки паразитування мікроспоридій з нечітко визначеною таксономічною позицією.

У печінці *M. barbatus* (Linnaeus), виловленої в літоральній частині Середземного моря у районі м. Монако, виявлено мікроспоридій, які викликали некроз та формували яйцевидні спори розмірами 1,5 × 2,5 мкм з великою задньою вакуоллю (Raabe, 1936). Стадії розвитку паразитів виглядали як одноядерні амебоїдні клітини, які ділились надвоє. Дочірні клітини формували еліпсовидні споронти з двома ядрами, а кожен споронт утворював дві одноядерні спори. Мікроспоридію було віднесено до виду *Glugea* (*Nosema*) *ovoidea* Thelohan, 1895, раніше описаного з трьохвусого морського налима — *Gaidropsarus tricirratus* Brunnich, 1768 (= *Motella tricirrata* (Brunnich, 1768) (Gadidae) та європейської цеполи — *Cepola macrophthalma* (Linnaeus, 1758) (= *C. rubescens* Linnaeus, 1766) (Cepolidae) з узбережжя Франції. Пізніше мікроспоридій, віднесених до цього виду, було зареєстровано також у аргентинської мерлузи — *Merluccius hubbsi* Marini, 1932 (Merluccidae) з узбережжя Патагонії (Reimer, Jessen, 1974). Усі наявні описи мікроспоридії включають неповні дані щодо її життєвого циклу, які не дають підстав до віднесення виду як до роду *Glugea,* так і до роду *Nosema*. Це послужило основою для віднесення виду до збірної групи *Microsporidium* (Spraque, 1977). Немає підстав до ідентифікації виявлених нами мікроспоридій з *M. ovoideum*, оскільки вони відрізняються як за локалізацією і розмірами спор, так і за наявністю типових ксеном, яких немає у *M. ovoideum*.

Іншу мікроспоридію — *Glugea anomala* (Moniez, 1887) Gurley, 1893, було зареєстровано в Чорному морі у барабулі — *M. barbatus ponticus,* бичків кругляка — *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) і трав'яника — *Gobius ophiocephalus* (Pallas, 1814) (Gobiidae), трьохголчастої — *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758 та малої південної — *Pungitius platygaster platygaster* (Kessler, 1859) колючок (Gasterosteidae), а також у середземноморського морського миня — *Gaidropsarus mediterraneus* (Linnaeus, 1758) (Lotidae) (Определитель..., 1975). Типовим хазяїном вказаного виду мікроспоридій є колючки *G. aculeatus* і *P. pungitius* (Gasterosteidae), а віднесення до *G. anomala* хазяїв з інших родин, таких як бичкові та миневі потребує перевірки. На відміну від *G. anomala*, виявлена нами мікроспоридія продукує дрібніші спори та має коротший полярний філамент (8—9 завитків), який у *G. anomala* складає 12—14 завитків (Canning et al., 1986). До того ж, остання зазвичай локалізується у підшкірній сполучній тканині і лише у випадках надзвичайно високої інтенсивності зараження — у інших органах, де продукує ксеноми, що досягають кількох міліметрів у діаметрі.

До впровадження в дослідження мікроспоридій методів електронної мікроскопії, переважну більшість мікроспоридій риб, що розвивалися усередині цистоподібних утворів, відносили до роду *Glugea* (Manwell, 1961), при цьому використовували термін «цисти» по аналогії з подібними структурами міксоспоридій. На відміну від цист — багатоклітинних утворів, стінки яких формуються головним чином зі сполучної тканини хазяїна — ксеноми мікроспоридій представляють видозмінену живу клітину хазяїна, виповнену спорами та стадіями розвитку паразита, інколи (але не завжди) оточену безструктурними чи структурованими елементами хазяїнного походження (Lom, Nilsen, 2003).

Таблиця 1. Порівняльна характеристика мікроспоридій з родів *Glugea* та *Loma*
Table 1. Comparative characteristic of microsporidia of the genera *Glugea* and *Loma*

Ознаки	*Glugea* spp.	*Loma* spp.
Форма ксеном	Округла, сферична	Сферична
Розміри ксеном	Перевищують 1 мм у діаметрі	Не перевищують 1 мм у діаметрі
Стінки ксеном	Товсті, складені з концентрично розміщених безструктурних шарів	Тонкі, складені з дрібногранулярного матеріалу
Розміщення ядра клітини хазяїна у цитоплазмі	Периферичне	Центральне
Розміщення стадій розвитку паразита всередині ксеноми	Стадії мерогонії на периферії, споронти, споробласти і спори у центрі	Усі стадії розвитку розмішені впереміжку
Локалізація	Клітини сполучної тканини різних органів	Клітини ендотелію зябер та травного каналу
Полярний філамент	Ізофілярний, досягає значної довжини, спіралевидна частина може бути укладена в кілька шарів	Ізофілярний, короткий, спіралевидна частина укладена в один шар
Задня вакуоль	Займає біля половини об'єму спори	Займає більш як половину об'єму спори, містить постеросому

На сьогодні з риб відомо 11 родів мікроспоридій, розвиток яких проходить усередині ксеном (*Spraquea* Weissenberg, 1976; *H. erosporis* Schubert, 1969; *Glugea* Thelohan, 1891; *T. ramicra* Matthews et Matthews, 1980; *Loma* Morrison et Spraque, 1981; *Microgemma* Ralphs et Matthews, 1986; *Neonosemoides* Faye, Toguebaye et Bouix, 1996; *Nosemoides* Vinckier, 1975; *Pseudoloma* Matthews, Brown et Larison, 2001; *Microfilum* Faye, Toguebaye et Bouix, 1991; *Ichthyosporidium* Caullery et Mesnil, 1905). Серед них, найбільш близькими до виявлених нами мікроспоридій є представники родів *Glugea* та *Loma*. Обидва утворюють багатоядерний мерогональний плазмодій, що розпадається на фрагменти чи поодинокі клітини, а їх стадії спорогонії оточені тонкою оболонкою спорофорної вакуолі. Головна відмінність поміж вказаними родами полягає у різній структурі ксеном (табл. 1). Окрім того, спори *Loma*, як правило, мають відносно короткий полярний філамент та крупну задню вакуоль з постеросомою всередині.

Порівняння отриманих нами неповних даних щодо життєвого циклу та ульраструктури спор дає підставу вважати виявлених мікроспоридій представниками роду *Loma*, не окреслюючи їхньої належності до виду.

Рід *Loma* включає в себе 12 видів, 7 з яких (*L. branchialis* Morrison et Spraque, 1981; *L. salmonae* Putz et al., 1984; *L. fontinalis* Morrison et Spraque, 1983; *L. diplodae* Bekhti et Bouix, 1982; *L. trichiuri* Sandeep et Kalavati, 1985; *L. embiotocia* Shaw et al., 1997; *L. mugili* Ovcharenko et al., 2000) паразитують у клітинах ендотелію зябер лососевих (Salmonidae), кефалевих (Mugilidae) та окуневих (Percidae) риб. У клітинах органів травлення риб зареєстровано 5 видів, серед яких *L. boopsi* Faye, Toguebaye et Bouix, 1995 виділено з печінки та кишкового каналу великоокого боопса — *Boops boops* (Linnaeus, 1758) (Sparidae); *L. myrophis* Azevedo et Matos, 2002 — зі стравоходу мирофіса *Myrophis platyrhynchus* (Ophichthidae); *L. dimorpha* Loubus et *al.*, 1984, *L. camerounensis* Fomena, Coste et Bouix, 1996 і *L. acerinae* — з травного каналу риб з родин бичкових (Gobiidae), цихлових (Cichlidae) та окуневих (Percidae). Для усіх видів роду за винятком *L. trichiuri* відомі дані з ультраструктури спор. Порівняння отриманих нами даних з існуючими не дає жодних підстав для їхньої ідентифікації. Спори виявлених нами мікроспоридій мають найкоротший полярний філамент, що складається з 8—9 завитків. Спори інших мікроспоридій з роду *Loma* мають полярний філамент, що

утворює від 11—12 (*L. camerounensis*) до 16—19 (*L. branchialis*) завитків (Azevedo, Matos, 2002). За середніми розмірами спор (2,4 × 4,1 мкм) виявлені нами мікроспоридії близькі до *L. diplodae* (2,22 × 4,17 мкм), проте остання продукує спори овальної форми з полярним філаментом, що має 17—18 завитків (Bekhti, Bouix, 1985).

Цілком ймовірно, що вивчені нами мікроспоридії є представниками нового виду, проте до отримання більш повних даних з ультраструктури спор та стадій розвитку ми маємо можливість для визначення лише родової приналежності виявлених паразитів.

Автори висловлюють щиру вдячність науковому співробітнику відділу паразитології Інституту біології південних морів НАН України Ю. М. Корнійчук та інженеру лабораторії паразитичних Protozoa Інституту паразитології ПАН Урсулі Чаплінськiй за допомогу у проведенні збору та опрацюванні матеріалу. Дослідження частково підтримано міжнародним грантом INTAS (реєстраційний № 5998).

Мальцев В. Н. Паразиты и инфекционные болезни дальневосточного пиленгаса в Азовском море // Матеріали наук.-практ. конф. паразитол. (Київ, 3—5 лист. 1999 р). — К. : Нац. аграр. ун-т, 1999. — С. 104—107.

Овчаренко Н. А. Новые и модифицированные методы исследования микроспоридий водных животных (обзор) // Гидробиол. журн. — 2002. — **38**, № 1. — С. 62—72.

Овчаренко Н. А., Сарабеев В. Л., Вита И., Чаплинска У. Loma mugili sp. n. — новая микроспоридия из жабер пиленгаса (Mugil soiuy) // Вестн. зоологии. — 2000. — **34**, № 4—5. — С. 9—15.

Определитель паразитов позвоночных Черного и Азовского морей. — Киев : Наук. думка, 1975. — С. 50—52.

Azevedo C., Matos E. Fine structure of a new species, Loma myrophis (Phylum Microsporidia), parasite of the Amazonian fish Myrophis platyrhynchus (Teleostei, Ophichthidae) // Europ. J. Protistol. — 2002. — **37**. — P. 445—452.

Bekthi M., Bouix G. Loma salmonae (Putz, Hoffman et Dunbar, 1965) et Loma diplodae n. sp. Microsporidies parasites de branchies de poissons téléeleostéens: implantation et données ultrastructurales // Protistologica. — 1985. — **21**. — P. 47—59.

Canning E. U., Lom J., Dyková I. The microsporidia of Vertebrates. — London ; Toronto : Academic Press, 1986. — 289 p.

Hauck A. K. A mortality and associated tissue reactions of chinook salmon, Onchorhynchus tshawytscha (Walbaum), caused by the microsporidian Loma sp. // J. Fish. Dis. — 1984. — **7**. — P. 217—229.

Lom J, Nilsen F. Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny // Intern. J. Parasitol. — 2003. — **33**. — P. 107—127.

Manwell R. D. Introduction to Protozoology. — New York : St. Martin's Press, 1961. — 641 p.

Raabe H. Etudes de micro-organismes parasites des poisons de mer. I. Nosema ovoideum Thél. Dans le foie des Rougets // Bull. Inst. Oceanogr. — 1936. — **696**. — P. 1—12.

Reimer L. W., Jessen O. Ein Beitrag zur Parasitenfauna von Merluccius hubbsi Marini // Wiss. Zeitsch. Pädagog. Hochsch. Güstrow. — 1974. — S. 53—64.

Spraque V. Systematics of the Microsporidia // Comparative Pathobiol. / Eds Jr. L. A. Bulla, T. C. Cheng. — New York ; London : Plenum Press, 1977. — Vol. 2. — P. 1—505.

Vávra J., Maddox J. V. Methods in Microsporidiology // Comparative Pathobiol. / Eds Jr. L. A. Bulla, T. C. Cheng. — New York ; London : Plenum Press, 1977. — Vol. 1. — P. 281—319.